

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/088819 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G02B 21/18**,
G01N 21/00

(74) Anwälte: **VON KIRSCHBAUM, Alexander** usw.; Bahn-
hofsvorplatz 1 (Deichmannhaus), 50667 Köln (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04623

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. April 2002 (26.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 21 064.7 28. April 2001 (28.04.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EVOTEC OAI AG** [DE/DE]; Schnackenburgallee
114, 22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KIRSCH, Achim**
[DE/DE]; Langenfelder Damm 70, 22525 Hamburg (DE).
STANGE, Roland [DE/DE]; Wichmannstr. 52, 22607
Hamburg (DE). **MÜLLER, Jürgen** [DE/DE]; Lohbekstieg
32f, 22529 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

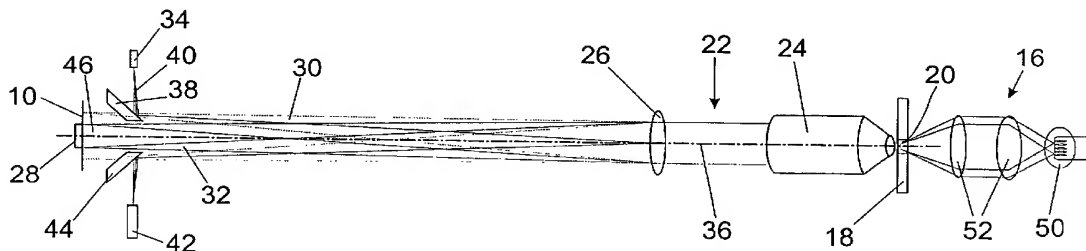
Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR THE OPTICAL MEASUREMENT OF CHEMICAL AND/OR BIOLOGICAL SAM-
PLES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR OPTISCHEN MESSUNG VON CHEMISCHEN UND/ODER
BIOLOGISCHEN PROBEN



(57) Abstract: An optical measuring device for the measurement of chemical and/or biological samples comprises an illumination device (16), for the illumination of the sample (20) for measurement. A lens arrangement (22) is further provided, for imaging a region of the sample in an image field (10). A first partial region (12) of the image field is recorded by a first detector (28) and a second partial region (14) of the image field (10) is recorded by a second detector (34). It is thus possible to change between two measuring techniques without switching or to carry out two measurements simultaneously on one sample.

(57) Zusammenfassung: Eine optische Meßvorrichtung zur Messung chemischer und/oder biologischer Proben weist eine Beleuchtungseinrichtung (16) zur Beleuchtung der zu messenden Probe (20) auf. Ferner ist eine Optikeinrichtung (22) zur Abbildung eines Probenbereichs in einem Bildfeld (10) vorgesehen. Ein erster Teilbereich (12) des Bildfeldes wird von einem ersten Detektor (28) und ein zweiter Teilbereich (14) des Bildfeldes (10) wird von einem zweiten Detektor (34) erfasst. Es ist somit möglich, zwischen zwei Meßverfahren ohne Umschalten zu wechseln oder zwei Messungen an einer Probe gleichzeitig durchzuführen.



WO 02/088819 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vorrichtung und Verfahren zur optischen Messung von chemischen und/oder biologischen Proben

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur optischen Messung von chemischen und/oder biologischen Proben. Die erfindungsgemäße Vorrichtung sowie das erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere zum Einsatz in Hoch- und Medium-Durchsatzscreening-Anlagen geeignet.

Für die mikroskopische optische Untersuchung von Proben gibt es verschiedene Meßmethoden, die unterschiedliche Informationen liefern. Dabei können entweder Bild- oder Punktmessungen durchgeführt werden. Bei Bildmessungen wird im Allgemeinen der Wert einer physikalischen Größe in Abhängigkeit vom Meßort aufgezeichnet. Die Messung dieser physikalischen Größe erfolgt entweder an vielen verschiedenen Punkten bzw. Meßorten parallel oder jeweils nur an einem Punkt und der Ort dieses Punktes, d.h. der Meßort, wird variiert. Letzteres wird oft als "Abrastern" der Probenfläche bezeichnet. Dabei muss jede Einzelmessung sehr schnell erfolgen, um innerhalb einer vertretbaren Zeit die Bildmessung abschließen zu können.

Als Bildmeßmethoden können z.B. eingesetzt werden: Hellfeld-, Dunkelfeld-, Total-Internal-Reflection-, Fluoreszenz-, 2-Photonen-Fluoreszenz-, Fluoreszenz-Lebensdauer-, Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie-, Polarisations und Fluoreszenz-Polarisations-Mikroskopie. Außerdem können diese Methoden mit unterschiedlichen Detektoren, wie z.B. Zeilen- oder Flächenkameras, ausgeführt

- 2 -

werden, und es gibt teilweise auch die Möglichkeit, sie sowohl in konventioneller als auch konfokaler Anordnung einzusetzen.

Im Gegensatz zur Bildmessung wird bei Punktmessungen die Messung nur an einem einzigen Ort in der Probe durchgeführt bzw. es wird die Ortsinformation nicht ausgewertet oder es wird gleichzeitig über eine Vielzahl von Meßorten gemittelt (konventionelle Messung mit einem großflächigen Detektor). Dementsprechend kann die einzelne Messung sowohl komplexer als auch zeitaufwendiger sein. Die Komplexität kann sich sowohl auf die Meßapparatur als auch auf die sich ergebenden Daten (z.B. ganze Spektren) beziehen. Z.B. zeichnet die Punktmeßmethode Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Fluktuation eines aus einem kleinen Volumen kommenden Fluoreszenzsignals über einen längeren Zeitraum auf und leitet daraus Informationen über photophysikalische, chemische und physikalische Eigenschaften fluoreszenter Partikel und Moleküle in diesem Volumen ab. Bei diesen Messungen geht man oft davon aus, dass das betrachtete Volumen repräsentativ für die Probe ist. Dies stimmt sicherlich für homogene Proben recht gut, jedoch nur in eingeschränktem Maße, wenn auch strukturierte Komponenten in der Probe vorkommen. Als mögliche Punktmeßmethoden kommen u.a. aber nicht ausschließlich FCS, FIDA, Fluoreszenz-Emissions-, Fluoreszenz-Anregungs- und Absorptions-Spektroskopie, Fluoreszenz-Lebensdauer-Spektroskopie und Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen in Betracht, wie sie in vielen wissenschaftlichen und technischen Publikationen beschrieben werden. Die Messungen können vielfach sowohl in konventioneller als auch in konfokaler Anordnung erfolgen.

Für die Charakterisierung von Substanzen auf mögliche pharmazeutische oder medizinische Anwendungen ist oftmals eine Untersuchung mit sowohl Bild- als auch Punktmeßmethoden sinnvoll und notwendig. Dann können aus Proben, die sowohl homogene, wie auch strukturierte Komponenten enthalten, Informationen über alle Komponenten extrahiert werden. Beispielsweise soll die Reaktion einer Probe von Zellen, von denen angenommen wird, dass sie bestimmte Moleküle in

- 3 -

die sie umgebende Lösung abgeben, auf eine zugegebene Testsubstanz untersucht werden. Über FCS kann in der Lösung eine unter Umständen auftretende biochemische Reaktion nachgewiesen werden, während die Fluoreszenzmikroskopie eine Untersuchung der Zellschicht erlaubt und z.B. Hinweise auf eine mögliche Toxizität der Testsubstanz gibt.

Mit Hilfe der Mehrkanal-Mikroskopie können bei einer Probe mit Bildmeßmethoden mehrere Messungen des gleichen Probenbereiches unter verschiedenen Meßbedingungen bzw. mit verschiedenen Detektoren erfolgen. Hiermit wird z.B. die Verteilung von verschiedenen Fluorophoren in der Probe, die sich anhand ihrer photophysikalischen Eigenschaften, wie den Anregungs-, Emissionsspektren und/oder Fluoreszenzlebensdauer, unterschieden, bestimmt.

Als Geräte, die Bildmeßmethoden mit Punktmeßmethoden kombinieren, ist das FCS-Instrument für intrazelluläre FCS von Brock (s. z.B. Brock, "Fluorescence Correlation Microscopy and Quantitative Microsphere Recruitment Assay", Dissertation, 1999) zu nennen. Dieses Gerät besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop, welches um die für FCS notwendigen Teile ergänzt wurde. Die Wahl zwischen den Meßmethoden der Mikroskopie oder FCS erfolgt durch einen im Strahlengang angeordneten Klappspiegel.

Ein derartiges mechanisches Umschalten des Strahlenganges mit Hilfe eines Klappspiegels führt zu dem, dass die Positionen der verschiedenen Meßvolumina zueinander bestimmt werden müssen. In Hochdurchsatz-Anwendungen kommt hinzu, dass dieser Schaltzyklus häufig durchgeführt werden muss, so dass ein mechanischer Verschleiß der Bauteile auftritt. Dieser Verschleißprozess beeinflusst insbesondere auch eine zuvor bestimmte Relativposition der Meßvolumina, so dass eine Neubestimmung in regelmäßigen Abständen wiederholt werden müsste. Ggf. muss sogar die gesamte Schalteinheit auf Grund des Verschleißes ausgewechselt werden. Vor allem für Hochdurchsatz-Anwendungen ergibt sich auch noch der Nachteil, dass durch den Schaltvorgang

- 4 -

Meßzeit verloren geht, und dadurch der erzielbare Probendurchsatz verringert wird.

So genannte Laser-Scanning-Mikroskope (LSM) erzeugen ein zweidimensionales Bild einer Probe durch ein sequenzielles Abrastern der Objektebene mit einem einzelnen kleinen Meßvolumen. Aus der Kenntnis der Position des Meßvolumens zu jedem Zeitpunkt und dem dazu aufgenommenen Meßwert kann ein Bild dieser Ebene erzeugt werden. Als mögliche Signale kommen Reflexions- und Fluoreszenzintensität, aber auch Anisotropie und Fluoreszenz-Anisotropie in Betracht. Bei diesen Mikroskopen ist eine Kombination mit Punktmeßmethoden, wie z.B. der Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie, relativ einfach, da nur die Bewegung des Meßvolumens ausgeschaltet werden muss, um eine ausreichende Meßzeit zu erhalten.

Die Verwendung von Laser-Scanning-Mikroskopen hat den Nachteil, dass die Meßzeiten der einzelnen Bilder relativ hoch sind. Der Einsatz derartiger Mikroskope ist für das Hochdurchsatz-Screening daher nicht möglich, da die erforderlichen geringen Meßzeiten bei ausreichender Signalqualität nicht erreicht werden können. Bei kurzen Meßzeiten weisen die Meßergebnisse nur ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, so dass es erforderlich ist, über mehrere Bilder zu mitteln. Diese Mittelung wird zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses durchgeführt und ist deshalb bei kurzen Meßzeiten für ein einzelnes Bild notwendig. Bei langen Meßzeiten kann man auch ohne Mittelung ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhalten. Dies erhöht wiederum die Meßzeit. Ferner ist das Laser-Scanning-Mikroskop auf das Verwenden relativ aufwendiger bildgebender Verfahren beschränkt.

Um mehrere Fluorophore in einem Mikroskop anhand ihrer Anregungs- und Emissionsspektren unterscheiden zu können, werden bei Mehrkanal-Mikroskopen spezielle optische Filter, Farbkameras und abbildende Spektrographen verwendet.

Wenn optische Filter verwendet werden, kommen in der Regel mindestens drei Filter zum Einsatz. Der erste Filter legt den Anregungswellenlängenbereich fest, der zweite Filter ist ein dichromatischer Spiegel, der das Anregungslicht reflektiert und das Emissionslicht transmittiert (oder umgekehrt). Vor dem Detektor wird ein weiterer Filter eingebracht, der nur den Emissionsbereich durchläßt. Für die Detektion verschiedener Fluorophore gibt es die Möglichkeit, alle drei Filter auszutauschen, wie es standardmäßig in den kommerziell erhältlichen Mikroskopen gemacht wird. Alternativ kann auch ein einzelner Filtersatz für mehrere Farbstoffe aufgebaut werden, wenn die Anregungs- und Emissionswellenlängen weit genug voneinander entfernt sind, wie es z.B. für die Farbstoffe DAPI, FITC und TRITC der Fall ist. Wenn diese Farbstoffe getrennt aufgenommen werden sollen, kann ein Farbfilm oder eine Farb-CCD-Kamera verwendet werden. Es kann auch eine Schwarzweiß-Kamera in Kombination mit wählbarem Anregungsspektrum verwendet werden, wie es z.B. auch in den sogenannten Pinkel-Filtersätzen gemacht wird. Mit Filtersätzen gibt es auch die Möglichkeit, Farbstoffe anhand ihrer Stokesverschiebung zu unterscheiden. So lassen sich verschiedene Farbstoffe mit der gleichen Wellenlänge anregen und unterscheiden sich in der unterschiedlichen Verschiebung des Emissionsspektrums.

Bei Mehrkanal-Mikroskopen müssen häufig zwischen den einzelnen Messungen einer oder mehrere Filter gewechselt werden. Dies hat für die Anwendung in Hochdurchsatz-Systemen erhebliche Nachteile, wie z.B. Verschleiß der Bauteile oder Meßzeitverluste, die sich durch die Schaltzeiten ergeben. Systeme, die mehrere Farbstoffe gleichzeitig detektieren können, sind auf nur wenige Farbstoffkombinationen beschränkt, da sich die Emissionsspektren ausreichend unterscheiden müssen und sich nicht mit den Anregungsspektren der anderen Farbstoffe überlagern dürfen. Außerdem ist die Herstellung derartiger optischer Filter, die für mehrere Farbstoffe geeignet sind, sehr aufwändig, so dass der Wechsel zu anderen Farbstoffen durch die beträchtlichen Entwicklungs- und

- 6 -

Herstellungskosten behindert wird. Dadurch ist man in der Wahl der möglichen Farbstoffe erheblich eingeschränkt. Dieser Nachteil gilt auch für die Systeme, die auf Spektrographen basieren, da auch bei Spektrographen das Anregungslicht abgeschwächt sein muss. Außerdem eignen sich abbildende Spektrographen nicht besonders gut, um ein Bild der Probe aufzunehmen, da die Aufnahme - und unter Umständen auch die Bearbeitungszeiten - häufig mehrere Sekunden betragen.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Messung chemischer und/oder biologischer Proben zu schaffen, mit der bzw. mit dem unterschiedliche Messungen einer Probe, insbesondere eine Bildmeßmethode und eine Punktmeßmethode, auf einfache Weise durchgeführt werden können.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß durch die Merkmale der Patentansprüche 1, 11 und 19.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass bei der Abbildung eines Probenbereiches in einem Bildfeld stets ein Teil des Bildfeldes nicht zur Untersuchung genutzt wird. Bei üblichen Optikeinrichtungen wird ein rundes Bildfeld 10 (Fig. 1) erzeugt. Innerhalb des Bildfeldes ist beispielsweise in einem ersten Teilbereich 12 des Bildfeldes 10 das Feld einer CCD-Kamera angeordnet. Der den ersten Teilbereich 12 umgebende Teil des Bildbereichs 10 wird somit zur Detektion von in der Probe auftretenden Reaktionen nicht genutzt. Der Kern der Erfindung besteht darin, einen zweiten Teilbereich des Bildfeldes in dem nicht genutzten Bereich des Bildfeldes mittels eines zweiten Detektors zu erfassen.

Die erfindungsgemäße optische Meßvorrichtung, die insbesondere für den Einsatz in Hochdurchsatzscreening-Anlagen geeignet ist, kann eine Beleuchtungseinheit zur Beleuchtung der zu messenden Probe aufweisen. Ferner ist eine Optikeinrichtung zur Abbildung eines Probenbereichs in dem Bildfeld vorgesehen. Ferner ist ein erster Detektor vorgesehen, der einen ersten Teilbereich des

- 7 -

Bildfeldes erfasst. Erfindungsgemäß ist ein zweiter Detektor vorgesehen, der einen zweiten Teilbereich des Bildfeldes erfasst.

Durch das Vorsehen von mindestens zwei Detektoren, die jeweils einen Teilbereich des Bildfeldes erfassen, ist es möglich, unterschiedliche Messungen gleichzeitig an einer Probe durchzuführen. Insbesondere ist es möglich, beispielsweise als ersten Detektor eine CCD-Kamera vorzusehen, mit der eine der vorstehend beschriebenen Bildmeßmethoden durchgeführt wird. Mit Hilfe des zweiten Detektors kann sodann vorzugsweise eine Punktmeßmethode, mittels der z.B. der zeitliche Verlauf eines Signals aufgezeichnet werden kann, vorgesehen werden.

Das Vorsehen eines Klappspiegels, um zwischen den für unterschiedliche Meßmethoden eingesetzten Detektoren umzuschalten, ist bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung nicht erforderlich. Dies hat zur Folge, dass kein mechanischer Verschleiß auftreten kann, durch den die Meßergebnisse, insbesondere die Relativposition zwischen den beiden Meßbereichen in der Probe, beeinträchtigt werden kann. Ferner entfällt der Schaltvorgang, d.h. das Umklappen des Spiegels, so dass die erforderliche Messungen in einem kurzen Zeitraum durchgeführt werden können. Dies ist insbesondere bei äußerst kostenintensiven Verfahren, wie dem Hochdurchsatzscreening, vorteilhaft. Die Möglichkeit, zwei unterschiedliche Messungen an einer Probe gleichzeitig durchzuführen, hat ferner den Vorteil, dass Effekte in einer Probe, die nur über einen kurzen Zeitraum auftreten, auch durch zwei Meßmethoden wahrgenommen werden können. Bei dem Einsatz von bekannten Vorrichtungen ist es hierzu erforderlich, mit Hilfe von zwei Proben nacheinander die beiden unterschiedlichen Messungen durchzuführen.

Gemäß der Erfindung erfolgt somit eine räumlich begrenzte Auskopplung mindestens eines Teilbereichs des Bildfeldes. Diese Auskopplung erfolgt vorzugsweise durch einen totalreflektierenden Spiegel, wobei der ausgekoppelte

- 8 -

Teilbereich durch einen Punktdetektor, wie einer Faserende, erfasst wird. Da die erfindungsgemäße Vorrichtung insbesondere zum Einsatz für Medium- und Hochdurchsatz-Screeningverfahren geeignet ist, werden vorzugsweise mit Hilfe der Vorrichtung einzelne Wells von Probenträgern, wie Titerplatten o.dgl., beobachtet. Durch die Vorrichtung wird somit vorzugsweise ein Teil der in einem Well befindlichen Flüssigkeit in einem Bild abgebildet, wobei ein Teilbereich dieses Well-Bildes ausgekoppelt wird. Es ist somit insbesondere beim Vorsehen eines totalreflektierenden Spiegels zum Auskoppeln des Teilbereiches möglich, unterschiedliche Bereiche des Bildes mit unterschiedlichen Detektoren, wie beispielsweise Flächen- und Punktdetektoren, zu erfassen. Das Vorsehen eines Klappspiegels oder eines dichroitischen Spiegels ist hierbei nicht erforderlich. Dies hat einerseits den Vorteil, dass kein mechanischer Verschleiß u.dgl. auftritt, und andererseits keine teuren dichroitischen Spiegel verwendet werden müssen.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann ferner auf einfache Weise eine Mehrkanal-Mikroskopie durchgeführt werden. Da die unterschiedlichen Teilbereiche des Bildfeldes, beispielsweise über das Vorsehen von Spiegeln, umgelenkt werden können, ist es möglich, in den einzelnen Strahlengängen unterschiedliche Filter anzuordnen. Ein Wechseln der Filter entfällt. Ebenso können in den beiden Strahlengängen sodann speziell auf die Anforderungen abgestimmte Filter eingesetzt werden. Das Vorsehen teurer Kombinationsfilter u.dgl. ist nicht erforderlich. Ebenso ist die Anzahl der verwendbaren Farbstoffe erheblich größer, da diese nicht mehr auf ein spezielles Filtersystem o.dgl. abgestimmt sein müssen.

Insbesondere erfolgt bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung die Trennung der beide Teilbereiche nicht über spektrale Unterschiede durch dichromatische Spiegel oder zeitlich sequenziell über das Ein- und Ausschwenken eines Spiegels.

Als Meßmethoden für die Bild- und/oder Punktmessung kommen sämtliche vorstehend erwähnte Methoden in Betracht.

- 9 -

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung befindet sich der erste Detektor auf der optischen Achse eines Objektivs der Optikeinheit. Ferner befindet sich im Randbereich des das Bildfeld erzeugenden Strahlengangs ein Spiegel, über den der zweite Teilbereich ausgekoppelt und auf den zweiten Detektor gelenkt wird. Dies hat den Vorteil, dass der zweite Detektor nicht unmittelbar neben dem ersten Detektor angeordnet sein muss. Hierdurch können unterschiedliche Detektoren eingesetzt werden, bei denen es ggf. nicht möglich ist, zwei Detektoren unmittelbar nebeneinander anzuordnen, da neben der Detektoroberfläche beispielsweise Steuerelement des Detektors o.ä. angeordnet sind.

Selbstverständlich ist es auch möglich, den ersten Detektor nicht unmittelbar auf der Achse des Objektivs anzuordnen, sondern ebenfalls den Strahlengang mittels Spiegel umzulenken. In jedem Fall ist bei dieser bevorzugten Ausführungsform in dem das Bildfeld erzeugenden Strahlengang ein den zweiten Teilbereich auskoppelnder Spiegel angeordnet. Der Spiegel ist vorzugsweise derart angeordnet, dass er außerhalb des Strahlengangs liegt, der von dem ersten Detektor erfasst wird. Eine Überschneidung der einzelnen Teilbereiche ist vorzugsweise vermieden. Da durch die Lage des den zweiten Teilbereich auskoppelnden Spiegels sichergestellt ist, dass dieser nicht in den Strahlengang ragt, der auf den ersten Detektor trifft, kann vorzugsweise ein totalreflektierender Spiegel eingesetzt werden. Dies hat den Vorteil, dass durch den Spiegel keine Beeinflussung der von dem zweiten Detektor wahrgenommenen Strahlung erfolgt.

Da im allgemeinen nur ein relativ kleiner Teil des Bildfeldes als erster Teilbereich genutzt wird, kann das verbleibende Bildfeld von mehreren Detektoren genutzt werden. Das Bildfeld wird somit in eine Anzahl von zwei, drei, vier oder mehr Teilbereichen aufgeteilt. Jeder dieser Teilbereiche kann wiederum über einen

- 10 -

Spiegel ausgekoppelt werden. Hierdurch sind Platzprobleme im Bereich des Bildfeldes vermieden.

Vorzugsweise sind die weiteren Detektoren bzw. die weiteren Spiegel, die entsprechende Teilbereiche für diese Detektoren auskoppeln, derart angeordnet, dass ein Überschneiden der Teilbereiche ausgeschlossen ist.

Da vorzugsweise mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine Bildmessung sowie eine Punktmessung durchgeführt wird, ist mindestens einer der Detektoren, vorzugsweise der zweite Detektor, als Punktdetektor ausgebildet. Hierbei kann es sich beispielsweise um das offene Faserende einer optischen Faser handeln. Bei einem derartigen Punktdetektor können beispielsweise zeitliche Verläufe der Fluoreszenz eines Stoffes gemessen werden.

Bei Meßsystemen mit hoher axialer Auflösung, wie beispielsweise bei konfokalen Mikroskopen, ist es ferner erforderlich, die axiale Position des Meßpunktes reproduzierbar einstellen zu können. Insbesondere bei Hochdurchsatzscreening-Verfahren muss die axiale Einstellung, d.h. die Fokussierung, automatisch und schnell erfolgen. Ein Eingriff von Bedienungspersonal ist nicht möglich, da dies zu viel Zeit in Anspruch nimmt und Hochdurchsatzscreening-Verfahren hierdurch unwirtschaftlich würden. Da die Qualität des empfangenen Signals stark abhängig ist von der axialen Position, ist es im allgemeinen erforderlich, die Fokussierung in jeder zu untersuchenden Probe zu wiederholen.

Zur Fokussierung ist es beispielsweise möglich, die Kontrastveränderungen eines durch einen Detektor aufgenommenen Bildes zu nutzen oder statistisch auszuwerten. Es besteht daher bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung die Möglichkeit, einen der Detektoren als Fokussierungseinrichtung zur axialen Feststellung des in dem Bildfeld abgebildeten Probenbereichs auszubilden. Einer der Detektoren, auf denen ein Teilbereich des Bildfeldes abgebildet wird, kann somit zur Fokussierung genutzt werden. Dies hat den Vorteil, dass keine

- 11 -

zusätzlichen Fokussiereinrichtungen erforderlich sind, die im allgemeinen eine gesonderte Lichtquelle erfordern, durch die die Meßergebnisse beeinflußt werden, da diese Lichtquelle ebenfalls Licht in die Probe einbringt.

Ferner können auch aktive Fokussiereinrichtungen verwendet werden, die sodann beispielsweise eine eigene Lichtquelle aufweisen, um Licht zur Fokussierung in die Probe einzubringen. Beispielsweise kann ein schräg in die Probe einfallender Lichtstrahl verwendet werden, der in der fluoreszierenden Probe eine Fluoreszenzlinie erzeugt. Die Reflexion dieses schräg einfallenden Lichtstrahls kann zur Fokussierung verwendet werden. Eine entsprechende Vorrichtung ist beispielsweise in US 6 025 601 beschrieben. Eine derartige Fokussierung mittels einer in der Probe auftretenden Linie ist insbesondere bei hellfluoreszierenden Proben nicht geeignet. Bei diesen Proben sollte eine möglichst geringe Anregungsleistung verwendet werden, um ein Ausbleichen der Probe und ggf. ein Schädigen von ggf. in der Probe vorhandenen lebenden Zellen zu vermeiden. Eine Verringerung der Anregungsleistung führt bei diesem Autofokus-System jedoch dazu, dass auch das Höhsignal abgeschwächt wird. Hierdurch wird die Fokuseinstellung schlechter. Ferner kann bei einer derartigen Fokussierungseinrichtung nur mit relativ kleinen numerischen Aperturen gearbeitet werden, da die Einstrahlung des Lichts in einem Winkel zur optischen Achse erfolgt. Hierdurch wird der Anregungsfokus größer, so dass die axiale Auflösung geringer wird.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Fokussiereinrichtung mit Aperturblende verwendet. Mit Hilfe der Aperturblende wird ein möglichst kleiner Punkt in der Probe beleuchtet. Das von diesem Punkt reflektierte Licht gelangt durch dieselbe Aperturblende auf einen geeigneten Detektor. Auf Grund der Konfokalität der Anordnung ist eine Fokussierung nur dann erfolgt, wenn sich eine reflektierende Fläche in der der Apertur entsprechenden Position in der Probe befindet. Erfolgt die Reflexion beispielsweise an einem Glasboden des Probenträgers, in dem die Proben

- 12 -

angeordnet sind, ist mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung ein einfaches Fokussieren auf den Glasboden möglich. Da die Dicke des Glasbodens und der optimale Abstand zwischen Meßpunkten in der Probe und dem Probenboden bekannt sind, kann nach dem Fokussieren auf den Glasboden durch eine entsprechende Relativverschiebung zwischen Probenträger und Objektiv sichergestellt werden, dass die Messung innerhalb der Probe in einem vorgegebenen Abstand zum Probenboden erfolgt. Ferner ist es möglich, die Ebene, in der sich die Aperturblende befindet, so zu wählen, dass im Falle eines Reflexionssignals vom Glasboden durch die Apertur die anderen Detektoren derart angeordnet sind, dass deren Fokus im interessierenden Probenbereich liegt.

Die Erfindung betrifft somit ferner eine optische Meßvorrichtung mit einer Beleuchtungseinheit und einer Optikeinheit wie vorstehend beschrieben. Ebenfalls wie vorstehend beschrieben wird ein erster Teilbereich des Bildfeldes von einem ersten Detektor erfasst. Anstelle oder zusätzlich zu einem zweiten Detektor ist eine Fokussiereinrichtung zur axiale Festlegung des in dem Bildfeld abgebildeten Probenbereichs vorgesehen. Die Fokussiereinrichtung weist eine einen Fokussierstrahl erzeugende Lichtquelle auf, wobei der Fokussierstrahl zumindest teilweise innerhalb des das Bildfeld erzeugenden Strahlengangs verläuft. Vorzugsweise ist ein Fokussierspiegel vorgesehen, der entsprechend dem vorstehenden Spiegel in dem Bildfeldstrahlengang angeordnet ist. Die Anordnung des Spiegels ist vorzugsweise wiederum derart, dass der Spiegel den von dem ersten Detektor wahrgenommenen Teilbereich des Bildfeldes nicht überschneidet, d.h. keinen Schatten auf den ersten Detektor wirft.

Vorzugsweise ist die Fokussiereinrichtung ggf. unter Verwendung eines entsprechend angeordneten Fokussierspiegels derart angeordnet, dass die Optikeinrichtung den Fokussierstrahl in Richtung der Probe lenkt. Vorzugsweise wird der von der Probe oder einer Grenzfläche eines Probenträgers reflektierte Fokussierstrahl ebenfalls von der Optikeinrichtung in Richtung der

- 13 -

Fokussiereinrichtung bzw. in Richtung des Fokussierspiegels gelenkt. Die Reflexion des Fokussierstrahls kann an unterschiedlichen Grenzflächen stattfinden. Beispielsweise kann die Reflexion der äußeren Oberfläche des Probenträgers, an der Bodenfläche des Probenträgers, d.h. der Innenseite des Probenträgerbodens, an dem die Probenflüssigkeit anliegt, oder auch an der Oberfläche der Probe selbst, d.h. an der Grenzfläche zwischen Probe und Umgebungsmedium, im allgemeinen der Luft, reflektiert werden. In Abhängigkeit der Grenzfläche, die zur Reflexion des Fokussierstrahls genutzt wird, muss eine entsprechende Einstellung der Objektivereinrichtung erfolgen, so dass sichergestellt ist, dass die Messung innerhalb der Probe in einem entsprechenden Abstand zu den Grenzflächen erfolgt. Hierdurch ist ein optimales Meßergebnis gewährleistet.

Selbstverständlich ist eine Kombination der beiden vorstehend beschriebenen Vorrichtungen möglich, so dass mehrere Detektoren vorgesehen sind, die unterschiedliche Teilbereiche des Bildfeldes detektieren, und zusätzlich eine Fokussiereinrichtung vorgesehen ist, die vorzugsweise keinen der Teilbereiche des Bildfeldes abdeckt, jedoch die Optikeinrichtung zum Leiten des Fokussierstrahls nutzt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur optischen Messung von chemischen und/oder biologischen Proben, insbesondere mittels Hochdurchsatzscreening-Anlagen. In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die zu messende Probe beleuchtet werden. Anschließend wird mit Hilfe einer Optikeinrichtung ein Probenbereich in einem Bildfeld abgebildet. Sowohl bei dem Probenbereich wie bei dem Bildfeld handelt es sich jeweils um einen räumlich begrenzten Bereich. In einem ersten Teilbereich des Bildfeldes wird mittels eines ersten Detektors das in dem Teilbereich abgebildete Bild erfasst. Ferner wird ein zweiter Teilbereich des Bildfeldes mittels eines zweiten Detektors erfasst. Dieses Verfahren weist gegenüber bekannten Verfahren dieselben Vorteile auf, die

anhand der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung erläutert sind.

Vorzugsweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur zwei, sondern drei, vier, fünf oder mehr Teilbereiche des Bildfeldes erfasst. Vorzugsweise überschneiden sich die einzelnen Teilbereiche nicht.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand bevorzugter Ausführungsformen unter Bezugnahme auf die anliegenden Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Bildfeldes,
- Fig. 2 eine schematische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit drei Detektoren,
- Fig. 3-5 schematische Darstellungen von Anordnungsmöglichkeiten des zweiten Detektors,
- Fig. 6-8 schematische Darstellungen von Ausgestaltungsmöglichkeiten des ersten Detektors zusammen mit einer Beleuchtungseinrichtung und
- Fig. 9 eine schematische Darstellung einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung in Kombination mit einer Fokussiereinrichtung.

In Fig. 1 ist ein Bildfeld 10 dargestellt, das üblicherweise von einer in Mikroskopen u.dgl. verwendeten Optikeinrichtung erzeugt wird. Es handelt sich bei dem Bildfeld 10 üblicherweise um einen kreisförmigen zweidimensionalen

- 15 -

Bereich. Innerhalb des Bildfeldes 10 ist ein erster Teilbereich 12 vorgesehen. In dem dargestellten Beispiel handelt es sich bei dem ersten Teilbereich 12 um einen rechteckigen Teilbereich, beispielsweise um ein Kamerafeld einer CCD-Kamera. Ein zweiter Teilbereich 14 ist ebenfalls innerhalb des Bildfeldes 10 angeordnet. In dem dargestellten Beispiel ist der zweite Teilbereich 14 als Kreis dargestellt. Es handelt sich beispielsweise um einen Teilbereich, in dem eine Punktmessung durchgeführt wird. Beispielsweise handelt es sich hierbei um einen als optische Faser ausgebildeten Detektor, so dass in dem Teilbereich 14 ein Faserende einer optischen Faser angeordnet ist.

Der schematische Aufbau einer erfindungsgemäßen optischen Meßvorrichtung (Fig. 2) weist eine Beleuchtungseinrichtung 16 auf, die eine beispielsweise in einer Titerplatte 18 angeordnete Probe 20 beleuchtet. Das von der Probe 20 abgegebene Licht bzw. die von der Probe 20 abgegebene Strahlung wird mit Hilfe einer Optikeinrichtung 22, die ein Objektiv 24 und mindestens eine Tubuslinse 26 aufweist, in Richtung eines ersten Detektors 28 gelenkt. In einer auf Höhe des Detektors 28 befindlichen Bildebene wird das Bildfeld 10 (Fig. 1) erzeugt. Das Bildfeld wird durch einen gestrichelt dargestellten Strahlengang 30 erzeugt. Der erste Detektor 28 erfasst den ersten Teilbereich 12 (Fig. 1). Dieser wird von einem ersten Strahlengang 32, der Teil des Bildfeldstrahlenganges 30 ist, begrenzt.

Ein zweiter Detektor 34, der zur Erfassung des zweiten Teilbereichs 14 des Bildfeldes 10 (Fig. 1) dient, ist in dem dargestellten Ausführungsbeispiel um 90° zu einer optischen Achse 36 gedreht angeordnet. Um den relevanten Teil des Bildfeldstrahlenganges 30 in Richtung des zweiten Detektors 34 zu lenken, ist ein totalreflektierender Spiegel 38 vorgesehen. Der Spiegel 38 koppelt einen Teil 40 des Bildfeldstrahlenganges 30 aus und lenkt diesen auf den zweiten Detektor 34.

Gegenüber dem zweiten Detektor 34 kann ein weiterer, dritter Detektor 42 angeordnet sein. Dieser ist entsprechend dem zweiten Detektor 34 senkrecht zu

- 16 -

der optischen Achse 36 angeordnet. Der auf dem dritten Detektor 42 abgebildete dritte Teilbereich des Bildfeldes 10 wird durch einen Spiegel 44 aus dem Bildfeldstrahlengang 30 ausgekoppelt. Selbstverständlich kann der dritte Detektor 42 zusammen mit dem Spiegel 44 auch in einer anderen Lage angeordnet sein und einen anderen Teilbereich des Bildfeldes 10 erfassen.

Wesentlich bei der Erfindung ist, dass der auf dem ersten Detektor 28 abgebildete Teilbereich 12, der durch einen Strahlengang 46 erzeugt wird, von dem zweiten und dritten Detektor 34,42 nicht beeinflusst wird. Wie aus Fig. 2 ersichtlich ist, verläuft der Strahlengang 46 zwischen den beiden Spiegeln 38,44, so dass keiner der beiden Spiegel 38,44 in den Strahlengang 46 hineinragt und hierdurch den auf den ersten Detektor 28 abgebildeten Teil der Probe 20 beeinträchtigen würde.

Die Beleuchtungseinrichtung 16 weist eine Lichtquelle 50 und eine Linsenordnung 52 auf. Durch die Linsenordnung 52 wird das von der Lichtquelle 50 abgegebene Licht auf die Probe gebündelt, so dass eine Konzentration des Lichts in der Probe 20 erfolgt. In dem dargestellten Ausführungsbeispiel ist die Beleuchtungseinrichtung 16 gegenüber der Objektivvorrichtung 22 angeordnet, so dass die Probe von der der Objektivvorrichtung 22 gegenüberliegenden Seite beleuchtet wird. Es handelt sich hierbei um die sog. Transmissionsbeleuchtung. Es ist ferner auch möglich, die Probe 20 durch eine Auflichtbeleuchtung zu beleuchten. Hierzu wird ein von einer Lichtquelle abgegebenes Licht über eine entsprechende Linsen- und Spiegelanordnung in das Objektiv 24 eingekoppelt und von diesem in die Probe gelenkt.

Bei dem ersten Detektor 28 handelt es sich beispielsweise um eine CCD- oder CMOS-Kamera. In Kombination mit einer geeigneten Zeilenbeleuchtung kann es sich bei dem ersten Detektor 28 auch um eine Zeilenkamera handeln. Ebenso kann als Detektor ein Spektrograph eingesetzt werden.

Als zweiter Detektor kann ein dem erste Detektor entsprechender Detektor oder eine Kombination der vorstehend genannten Detektoren vorgesehen werden. Es besteht ferner die Möglichkeit, einen oder mehrere der Detektoren 28,34,42 beispielsweise als Fluoreszenz-Emissionsspektroskop, ggf. in Kombination mit geeigneten Filtern, vorzusehen. Ebenso können die Detektoren auch als FCS- oder FIDA-Detektoren ausgelegt werden.

In den Fig. 3-5 sind unterschiedliche Anordnungsmöglichkeiten des zweiten Detektors 34 dargestellt. Die Beleuchtungseinrichtung 16 ist in diesen Figuren jeweils nicht dargestellt.

In Fig. 3 ist der Spiegel 38 vor einer Bildebene 54, in der sich das Bildfeld 10 befindet, angeordnet. Die Ablenkung eines Strahlenbündels 40 erfolgt wie vorstehend anhand Fig. 2 beschrieben. Der zweite Detektor 34 ist in einer Bildebene 56 angeordnet, bei der es sich um einen Teil der Bildebene 54 handelt, der durch den Spiegel 38 umgelenkt wurde.

Es ist auch möglich, den Spiegel 38 in einer Zwischenbildebene 58 (Fig. 4) anzuordnen. Um den Detektor 34 wiederum in der Bildebene 56 anzuordnen, ist zwischen dem Spiegel 38 und dem Detektor 34 eine Linse 60 vorgesehen. Entsprechend ist zwischen der Zwischenbildebene 58 und der Bildebene 54 eine weitere Linse 62 vorgesehen, durch die der erste Teilbereich 10 auf den Detektor 28 abgebildet wird. Wenn die Detektoren 28,34 keine Abbildung der Probe erfordern (z.B. Punkt-Intensitätsmessungen oder direktes Einkoppeln in einen Spektrographen) kann auch auf die Linsen 60,62 verzichtet werden.

Wie in Fig. 5 dargestellt, ist es auch möglich, den Spiegel 38 auf den Strahlengang bezogen hinter der Zwischenbildebene 58 anzuordnen. Entsprechend Fig. 4 ist wiederum zwischen dem Spiegel 38 und der Bildebene 56

des Detektors 34 die Linse 60 angeordnet. Ebenso ist die Linse 62 zwischen der Zwischenbildebene 58 und der Bildebene 54 des Detektors 28 vorgesehen.

In den Fig. 6-8 ist die Beleuchtungseinrichtung 16 jeweils zwischen der Zwischenbildebene 58 und der Bildebene 54 angeordnet. Die Beleuchtungseinrichtung weist eine Linse oder Linsenordnung 52 auf. Das von der Lichtquelle 50, bei der es sich auch um eine Zeilenbeleuchtung 64 (Fig. 7 und 8) handeln kann, abgegebene Licht wird über einen teildurchlässigen oder dichromatischen Spiegel 66 in den zwischen dem Objektiv 24 und der ersten Detektoreinheit 28 verlaufenden Strahlengang eingekoppelt. Der zweite Detektor 34 ist zusammen mit dem Spiegel 38 in den in den Fig. 6-8 dargestellten Ausführungsbeispielen jeweils vor der Zwischenbildebene 58 angeordnet.

Bei der in Fig. 6 dargestellten herkömmlichen Lichtquelle 50 ist diese mit einer CCD- oder CMOS-Kamera als erster Detektor 28 kombiniert. In Fig. 7 ist eine Zeilenbeleuchtung 64 vorgesehen, die mit einem Zeilendetektor als erster Detektor 28 kombiniert ist. Zur Erzielung eines vollständigen Bildes einer Probenebene muss die Zeile relativ zur Probe 20 bewegt werden. Dies erfolgt entweder durch Bewegen der Probe oder durch Bewegen des in die Probe einfallenden Lichtstrahls, z.B. über einen oszillierenden Spiegel. Anstelle einer Zeilenkamera kann als erster Detektor 28 auch ein abbildender Spektrograph verwendet werden (Fig. 8). Dieser weist neben einer Bildaufnahmeeinrichtung 68 eine Spiegelanordnung aus zwei planaren Spiegeln 69 sowie einem Hohlspiegel 71 auf. Die planaren Spiegel 69 können gegeneinander verkippt werden.

In dem in Fig. 9 dargestellten Ausführungsbeispiel ist anstelle des zweiten Detektors 34 eine Fokussiereinrichtung 70 angeordnet. Selbstverständlich kann zusätzlich zu der Fokussiereinrichtung 70 einer oder mehrere Detektoren 34,42 angeordnet sein. Der Spiegel 38 ist, wie vorstehend beschrieben und insbesondere wie aus Fig. 2 ersichtlich, angeordnet. Durch eine Lichtquelle 72 wird Licht über eine Linse 74 auf einen teildurchlässigen Spiegel 76 geleitet. Von

- 19 -

diesem wird das Licht in Richtung einer Aperturblende 78 umgelenkt. Die Aperturblende befindet sich in oder in der Nähe einer Bildebene. Hierdurch wird ein Punkt in der Probe beleuchtet. Das von diesem Punkt in der Probe reflektierte Licht gelangt ebenfalls über den Spiegel 38 wieder in Richtung der Aperturblende 78. Nach dem Passieren der Aperturblende 78 wird das von der Probe 20 zurückkommende Licht von dem teildurchlässigen Spiegel 76 hindurchgelassen und über eine Linse 80 auf einen Detektor 82 gelenkt. Mit Hilfe der dargestellten Fokussiereinrichtung ist eine Fokussierung auf eine reflektierende Fläche der Probe, beispielsweise eine Grenzfläche der Titerplatte oder eine Oberfläche der Probe, möglich. Bei entsprechender Fokussierung gelangt ein Maximum an von der Probe reflektiertem Licht durch die Aperturblende zu dem Detektor 82. Wenn bekannt ist, dass beispielsweise auf den Glasboden eines Probenträgers 18 fokussiert wurde, kann anschließend die Optikeinheit um einen bestimmten Betrag verschoben werden, so dass in dem Bildfeld 10 ein innerhalb der Probe liegender Bereich abgebildet wird. Es kann die Aperturblende 78 auch so weit aus der Bildebene 56 verschoben werden, dass ein Signal am Detektor 82 mit einer Fokussierung des interessierenden Probenbereichs auf dem Detektor 28 einhergeht.

Es sind auch andere Fokussierungseinrichtungen möglich, bei denen die Fokussierung beispielsweise über den Kontrast oder über eine in der Probe erzeugte Fluoreszenzlinie erfolgt.

Beispielsweise können als Fokussier-Sensoren 2x2-Phasenkoppler eingesetzt werden. Hierbei dann die Faser selbst als die den autofokalen Meßort bestimmende Apertur verwendet werden. Ebenso ist es möglich, eine zusätzliche Aperturblende einzusetzen. Beispielsweise kann bei rasternden Systemen, wie Zeilendetektoren, der Meßpunkt für den Autofokus auch in Scanrichtung vor der Zeile liegen. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, die Höhenregelung ohne Phasenversatz in der Regelschleife durchzuführen, da der Meßpunkt den Meßwert in einer Position aufnimmt, die der eigentliche Detektor erst später erreicht. Da

- 20 -

der Autofokusmeßpunkt neben dem mit dem Bilddetektor erfassten Bereich liegt, ist die Verwendung einer Korrektur der Höhe entsprechend der Schiefelage der Probe sinnvoll. Eine derartige Korrektur ist immer dann sinnvoll, wenn ein lateraler Versatz von Meßpunkten auftritt.

Ein wesentliches Merkmal der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht, wie insbesondere aus den Figuren ersichtlich ist, darin, dass der auskoppelnde Spiegel bzw. die Detektoren, d.h. die Faser oder andere Punktdetektoren, vor, in oder hinter der Bildebene angeordnet sind. Insbesondere sind die Detektoren nahe der Bildebene angeordnet.

PATENTANSPRÜCHE

1. Optische Meßvorrichtung zur Messung chemischer und/oder biologischer Proben, insbesondere für Hochdurchsatzscreening-Anlagen, mit

einer Optikeinrichtung (22) zur Abbildung eines Probenbereichs in einem Bildfeld (10),

einem einen ersten Teilbereich (12) des Bildfeldes (10) erfassenden ersten Detektor (28) und

einem einen zweiten Teilbereich (14) des Bildfeldes (10) erfassenden zweiten Detektor (34).
2. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Beleuchtungseinrichtung (16) zur Beleuchtung der zu messenden Probe (20).
3. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Detektor (28) auf der optischen Achse (36) eines Objektivs (24) der Optikeinheit (22) angeordnet ist.
4. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass in dem das Bildfeld (10) erzeugenden Strahlengang (30) ein den zweiten Teilbereich (14) auskoppelnder Spiegel (38) angeordnet ist.
5. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel (38) totalreflektierend ist.

- 22 -

6. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-5, gekennzeichnet durch weitere Detektoren (42) zur Erfassung weiterer Teilbereiche des Bildfeldes (10).
7. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Teilbereiche (12,14) nicht überschneiden.
8. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Detektor (34) ein Punktdetektor ist.
9. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Punktdetektor eine offenes Faserende einer optischen Faser ist.
10. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Optikeinrichtung (22) nur ein Objektiv (24) aufweist.
11. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass einer der Detektoren (28,34,42) als Fokussiereinrichtung (70) zur axialen Festlegung des in dem Bildfeld (10) abgebildeten Probenbereichs ausgebildet ist.
12. Optische Meßvorrichtung zur Messung chemischer und/oder biologischer Proben (20), insbesondere für Hochdurchsatzscreening-Anlagen, mit

einer Optikeinrichtung (22) zur Abbildung eines räumlich begrenzten Probenbereichs in einem räumlich begrenzten Bildfeld (10),

einem einen ersten Teilbereich (12) des Bildfeldes (10) erfassenden ersten Detektor (28) und

einer Fokussiereinrichtung (70) zur axialen Festlegung des im Bildfeld (10) abgebildeten Probenbereichs, mit einer einen Fokussierstrahl erzeugenden Lichtquelle (72), wobei der Fokussierstrahl zumindest teilweise innerhalb des das Bildfeld (10) erzeugenden Strahlengangs (30) verläuft.

13. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch eine Beleuchtungseinrichtung (16) zur Beleuchtung der zu messenden Probe (20).
14. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, gekennzeichnet durch einen im Bildfeld-Strahlengang (30) angeordneten Fokusspiegel (38) zur Ein- und/oder Auskopplung des Fokusstrahls.
15. Optische Meßvorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Fokusspiegel (38) außerhalb eines auf den ersten Detektor (28) treffenden ersten Strahlengangs angeordnet ist.
16. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Optikeinrichtung (22) den Fokussierstrahl in Richtung der Probe (20) lenkt.
17. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Optikeinrichtung (22) den von der Probe (20) oder einer Grenzfläche eines Probenträgers (18) reflektierten Fokussierstrahl in Richtung der Fokussiereinrichtung (70) bzw. in Richtung des Fokussierspiegels (38) lenkt.
18. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12-17, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussiereinrichtung eine Aperturblende (78) aufweist, durch die sowohl der auf die Probe (20) gerichtete Fokussierstrahl

- 24 -

als auch das von der Probe (20) oder einer Grenzfläche reflektierte Licht verläuft.

19. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12-18, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinrichtung (16) den Fokussierstrahl erzeugt.
20. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12-19, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussiereinrichtung eine Glasfaser aufweist, durch die sowohl der auf die Probe (20) gerichtete Fokussierstrahl als auch das von der Probe (20) oder einer Grenzfläche reflektierte Licht verläuft.
21. Optische Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1-11, gekennzeichnet durch eine Fokussiereinrichtung (70) nach einem der Ansprüche 12-20.
22. Verfahren zur optischen Messung von chemischen und/oder biologischen Proben (20), insbesondere mittels Hochdurchsatzscreening-Anlagen, mit den Schritten:
 - Abbilden eines Probenbereichs in einem Bildfeld (10),
 - Erfassen eines ersten Teilbereichs (12) des Bildfeldes (10) mittels eines ersten Detektors (28) und
 - Erfassen eines zweiten Teilbereichs (14) des Bildfeldes (10) mittels eines zweiten Detektors (34).
23. Verfahren nach Anspruch 22, bei welchem die Probe (20) beleuchtet wird.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, bei welchem weitere Teilbereiche (12,14) des Bildfeldes (10) erfasst werden.

- 25 -

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-24, bei welchem der abzubildende Probenbereich in dem Bildfeld (10) fokussiert wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25, bei welchem ein Fokussierstrahl erzeugt wird, der zumindest teilweise innerhalb eines das Bildfeld (10) erzeugenden Strahlengangs (30) verläuft.

- 1/8 -

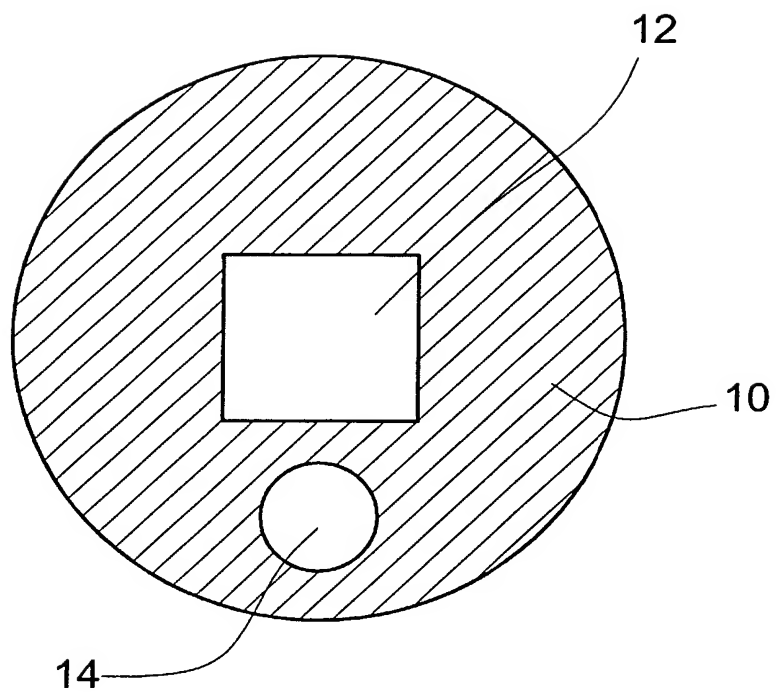


Fig.1

- 2/8 -

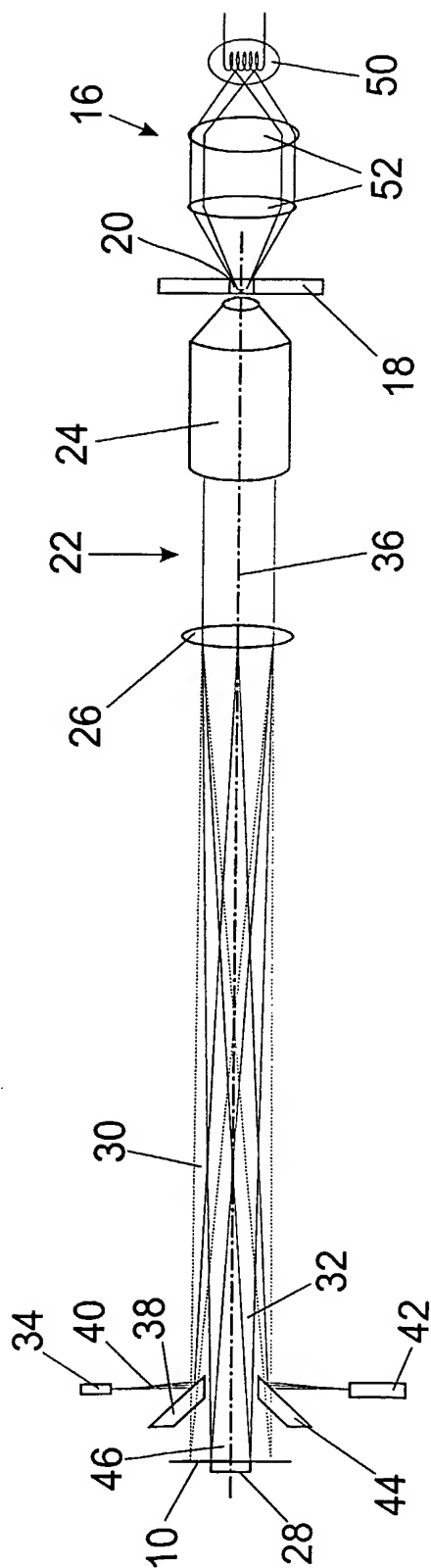


Fig.2

- 3/8 -

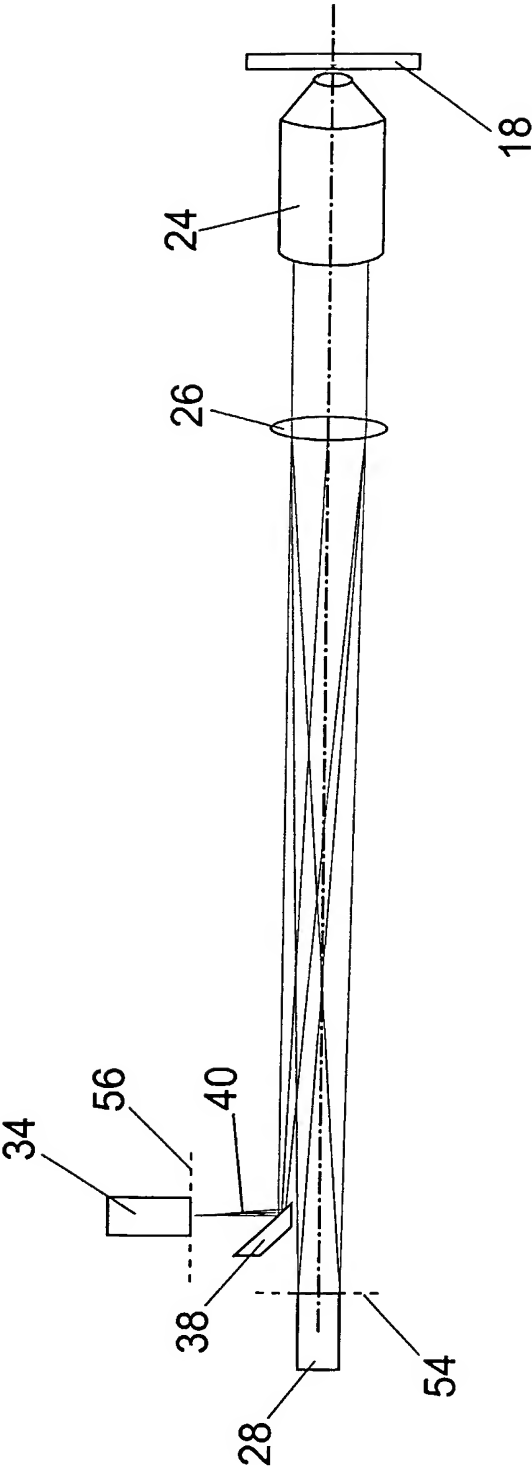


Fig.3

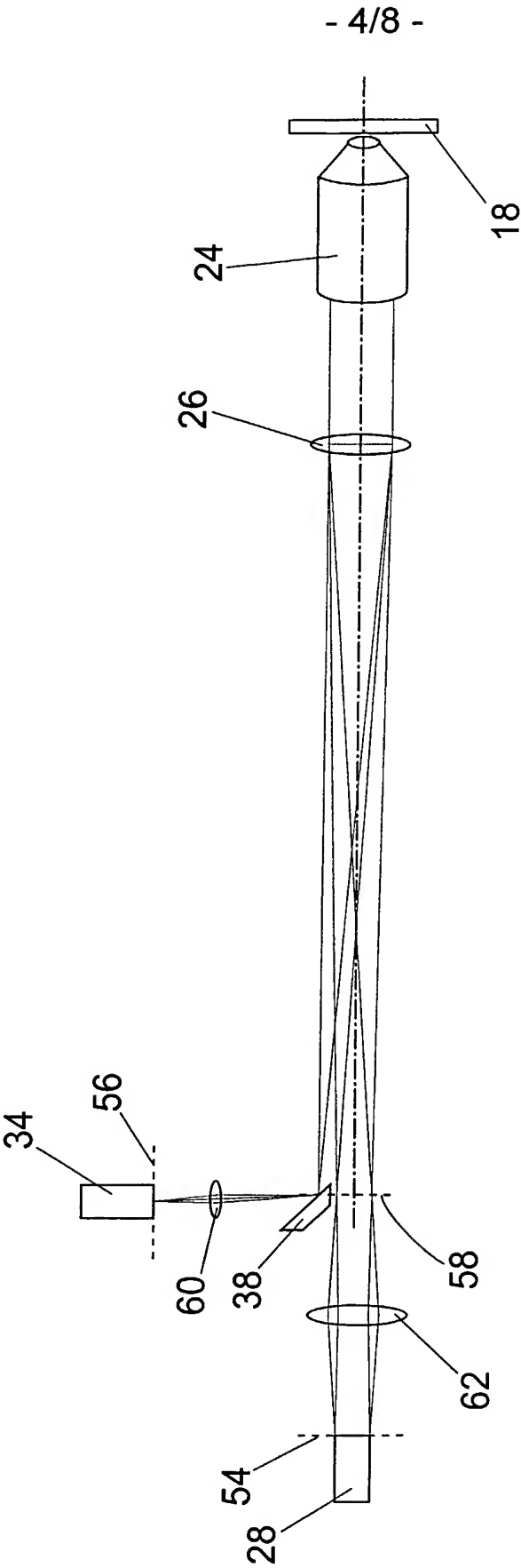


Fig.4

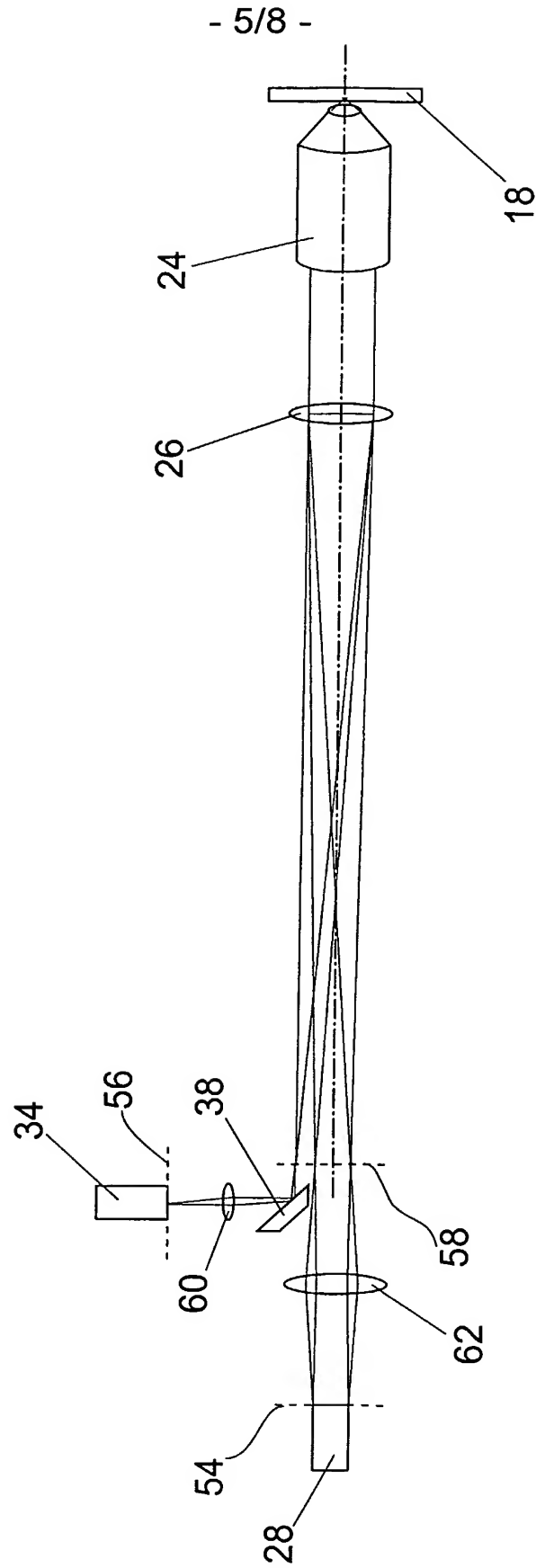
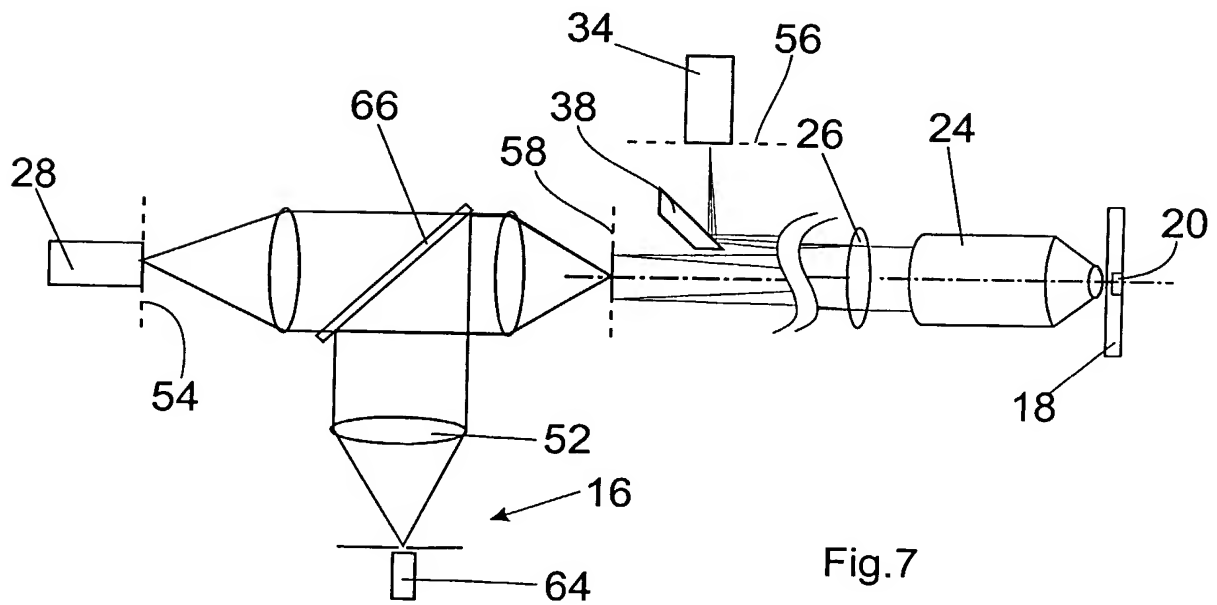
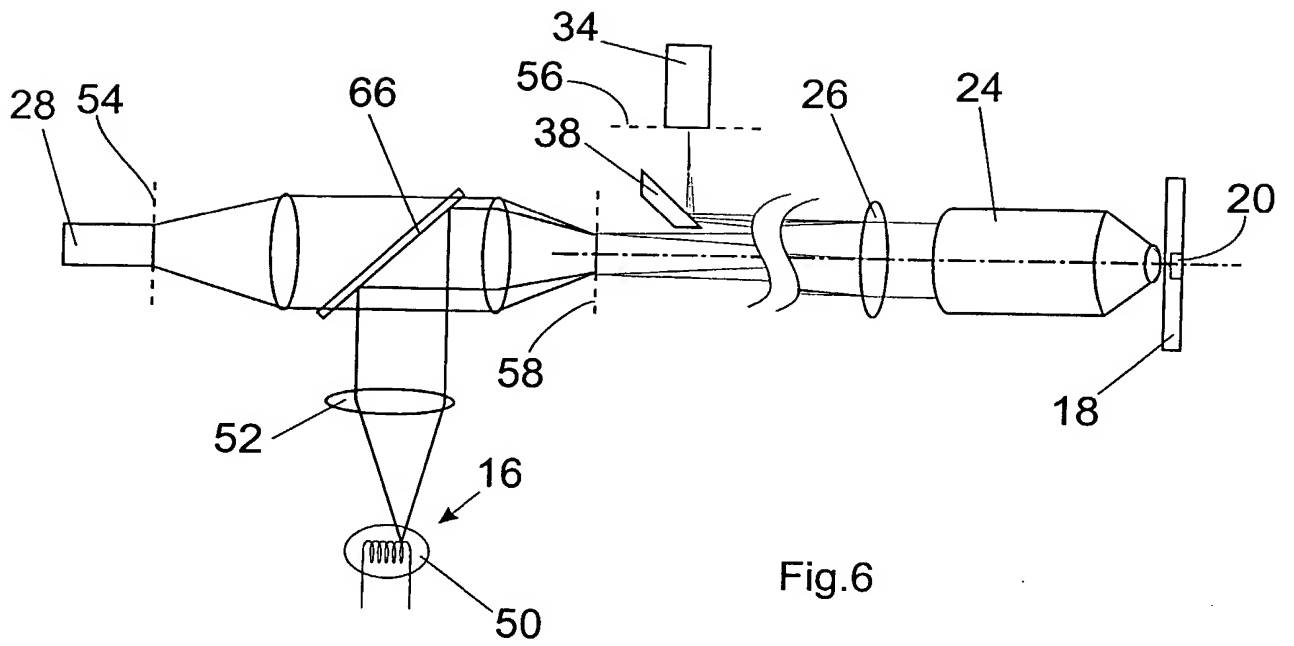


Fig. 5

- 6/8 -



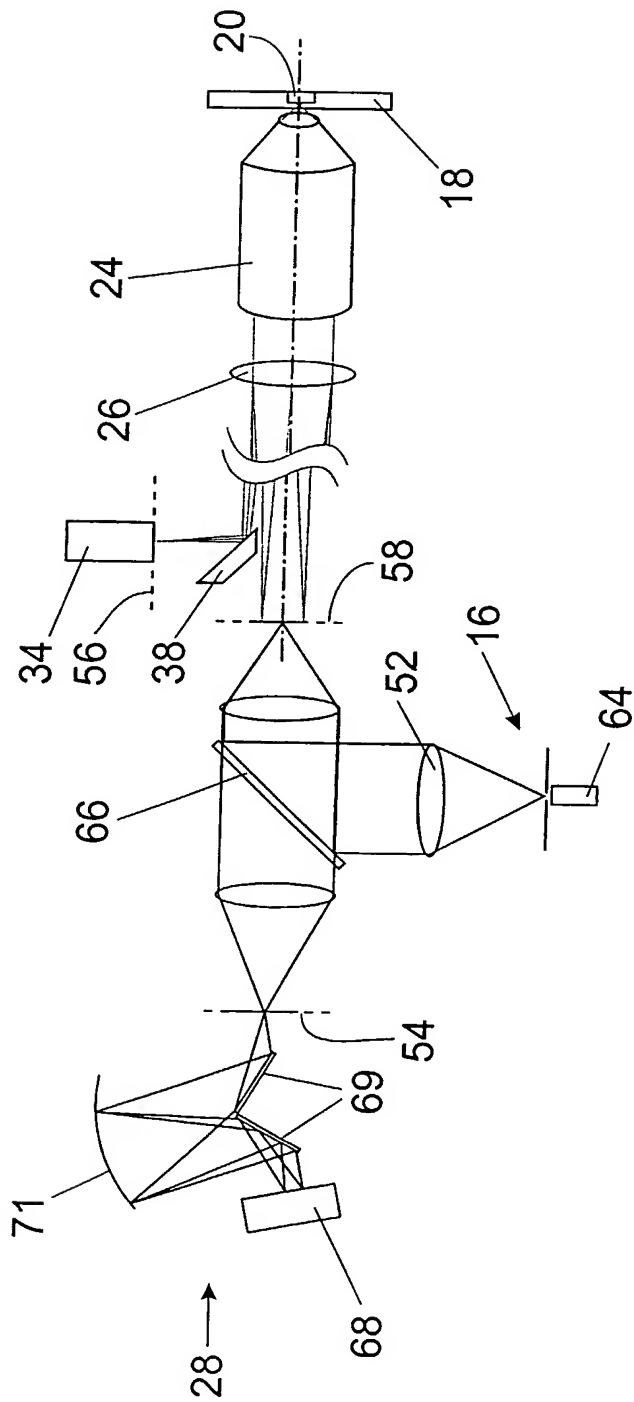


Fig.8

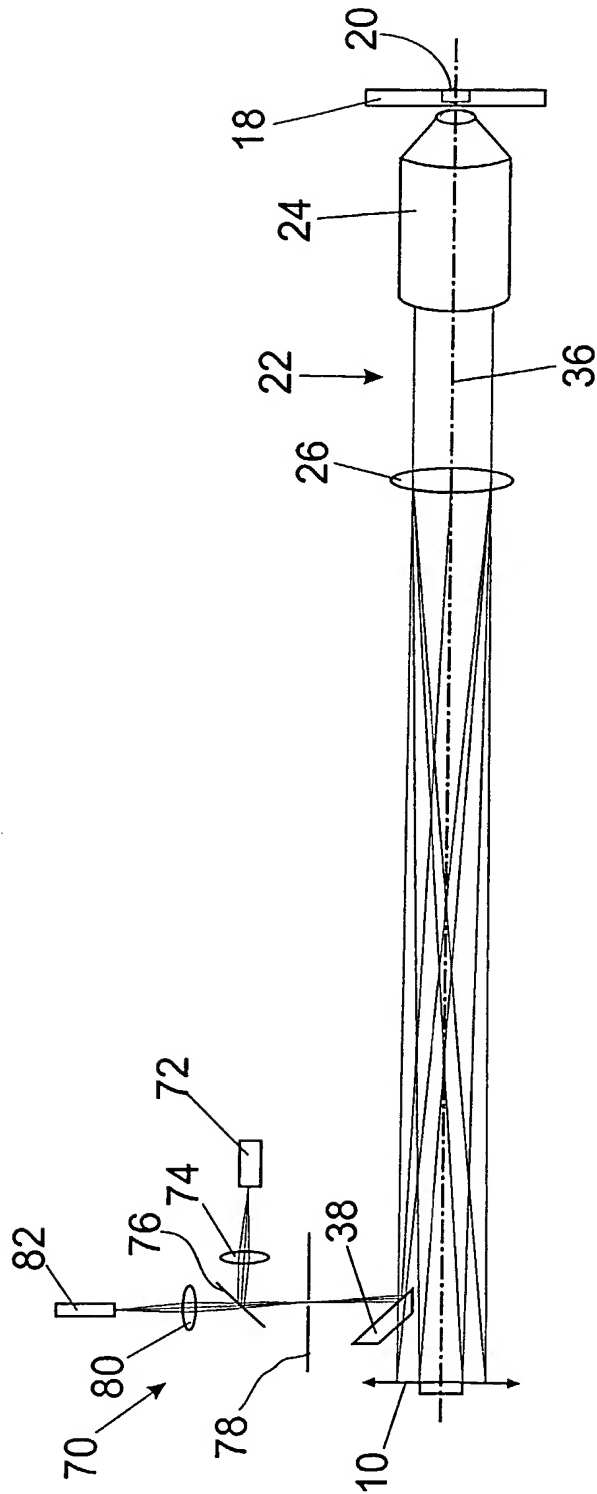


Fig.9